



Universitat de Lleida

Determinación de compuestos fenólicos en plasma y HDL.

Evaluación del efecto del consumo de aceites de oliva enriquecidos en compuestos fenólicos.

Trabajo Fin de Grado

Alumna: Joana Cardell Mohr

Tutora: M. José Motilva Casado

Co-tutora: Laura Rubió Piqué

Grado en Nutrición Humana y Dietética

Facultad de Medicina

Curso 2012/2013



Universitat de Lleida

Determinación de compuestos fenólicos en plasma y HDL.

Evaluación del efecto del consumo de aceites de oliva enriquecidos en compuestos fenólicos.

Trabajo Fin de Grado

Tutora: M. José Motilva Casado

Co-tutora: Laura Rubió Piqué

Índice

1. Resumen	4
2. Introducción	6
2.1 Dieta Mediterránea, aceite de oliva y prevención de enfermedades cardiovasculares.	6
2.2 Compuestos fenólicos del aceite de oliva y su metabolismo	7
2.3 Importancia de las LDL y HDL en enfermedades cardiovasculares	8
3. Hipótesis	10
4. Objetivos.....	12
5. Material y métodos.....	13
5.1 Diseño del estudio	13
5.2 Equipos, material y disoluciones	15
5.2.1 Equipos y material.....	15
5.2.2 Reactivos y disoluciones.....	15
5.3 Extracción de los compuestos fenólicos	16
5.3.1 Extracción en plasma	16
5.3.2 Extracción de HDL	17
5.4 Análisis cromatográfico mediante UPLC-MS/MS	18
5.5 Análisis estadístico	19
6. Resultados.....	20
6.1 Grado de cumplimiento.....	20
6.2 Marcadores de consumo de fenoles en plasma	21
6.3 Relación del grado de cumplimiento y la concentración fenólica en plasma.	25
6.4 Metabolitos fenólicos en HDL	28
7. Discusión	31
8. Conclusiones	35
9. Referencias bibliográficas	36

1. Resumen

Antecedentes: El aceite de oliva es la principal fuente de grasa de la Dieta Mediterránea. Actualmente queda establecido su efecto preventivo y beneficioso sobre las enfermedades cardiovasculares (ECV), atribuyéndose en gran parte a sus compuestos fenólicos. Los aceites de oliva enriquecidos en compuestos fenólicos aparecen como una buena estrategia de alimento funcional, sin embargo se ha visto que un aporte único de una dosis muy alta de un tipo de antioxidante podría tener un efecto indeseado aumentando el estrés oxidativo. Además, los fenoles del aceite de oliva aportan un carácter amargo indeseado para los consumidores. Es por esto que se planteó el diseño de dos aceites funcionales, un aceite de oliva enriquecido con sus propios fenoles y otro con la misma dosis de fenoles pero complementado con otra fuente fenólica, concretamente tomillo. Uno de los principales factores a tener en cuenta es la determinación de la biodisponibilidad y metabolismo de los compuestos fenólicos del aceite de oliva y del tomillo, para, posteriormente, ejercer su efecto en diferentes tejidos diana. Una posible diana de los compuestos fenólicos y sus metabolitos son las lipoproteínas de alta densidad (HDL), de manera que la bioactividad de los fenoles del aceite de oliva y del tomillo podría ser debida, en parte, a la incorporación de sus metabolitos en las HDL.

Objetivos: primeramente, estudiar la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos y determinar qué metabolitos presentes en plasma podrían ser biomarcadores de consumo de los aceites. En segundo lugar, evaluar cómo afecta el consumo de diferentes aceites de oliva enriquecidos con diferentes fuentes fenólicas en la composición de fenoles de las HDL y sus implicaciones en la salud.

Material y métodos: se llevó a cabo un estudio randomizado y cruzado con 19 individuos a fin de recibir 25 mL/día de aceite crudo durante tres periodos de tres semanas y con periodos de *wash-out* de dos semanas. Los aceites administrados fueron: VOO, de bajo contenido en compuestos fenólicos

(80 ppm), FOO1 enriquecido con compuestos fenólicos propios del aceite de oliva (500 ppm) y FOO2 enriquecido con compuestos fenólicos propios del aceite de oliva (250 ppm) y compuestos fenólicos del tomillo (250 ppm). Se recogieron muestras de plasma antes y después de cada tratamiento y se aislaron las HDL. Las muestras fueron pretratadas mediante la técnica de microelution de extracción en fase sólida (μ SPE) en plasma y mediante extracción en fase sólida (SPE) en HDL y analizadas mediante cromatografía de líquidos ultra-alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas en tándem como sistema de detección (UPLC-MS/MS).

Resultados: Los metabolitos establecidos como marcadores de consumo de los aceites fueron aquellos encontrados en concentraciones más elevadas en los plasmas y en un mayor número de individuos (diferencias significativas de estos marcadores respecto al *wash-out* y respecto al aceite de oliva control $p < 0.05$). Los metabolitos del aceite de oliva elegidos como biomarcadores fueron el hidroxitirosol sulfato, alcohol homovanílico sulfato e hidroxitirosol acetato sulfato, mostrándose una correlación bastante clara entre la concentración de estos metabolitos y el grado de cumplimiento de la ingesta del aceite FOO1. En el caso de los metabolitos derivados del tomillo los biomarcadores fueron el timol sulfato, ácido hidroxifenilpropionico sulfato y ácido cafeico sulfato, en estos la correlación no fue tan clara. En las HDL se encontraron diferencias estadísticas entre el pre- y post-tratamiento. Los metabolitos con mayor adherencia a las HDL fueron el alcohol homovanílico sulfato (aunque solo en un 21,05% de los individuos) y los metabolitos marcadores de consumo del timol.

Conclusiones: Los metabolitos descritos en el trabajo y detectados en plasma podrían ser los responsables de los efectos beneficiosos. La detección y cuantificación de algunos de ellos en las HDL nos permite confirmar que los fenoles del aceite de oliva y sobre todo los del tomillo son capaces de adherirse e incorporarse a las HDL, modulando así su contenido y contribuir en su defensa antioxidante.

2. Introducción

2.1 Dieta Mediterránea, aceite de oliva y prevención de enfermedades cardiovasculares.

La palabra dieta proviene del griego *diaita*, la cual significaba estilo de vida equilibrado. Exactamente esto es la Dieta Mediterránea [1], ya que no es únicamente un tipo de alimentación sino un estilo de vida particular de todos y cada uno de los pueblos que rodean el Mar Mediterráneo.

La denominación y la fama de la Dieta Mediterránea se establecieron tras el Estudio de los Siete Países llevado a cabo en la década de 1950 por Ancel Keys, tras observar las bajas tasas de enfermedad cardiovascular en la cuenca del Mediterráneo. Los investigadores atribuyeron éstas diferencias a los hábitos alimenticios propios de esta zona [2] y, actualmente, queda establecido el efecto cardioprotector de la Dieta Mediterránea [3].

Aunque se pueden encontrar variaciones en las dietas de los países que rodean el Mar Mediterráneo, se puede hablar de unos componentes comunes en todos ellos: 1) el principal aporte de grasas está constituido por el aceite de oliva; 2) consumo alto en vegetales, legumbres, cereales, frutos frescos y secos; 3) moderado consumo de pescado, carne de ave, leche y productos derivados de la leche; 4) bajo consumo de carne roja [4,5]; y 5) moderado consumo diario de vino [6].

El aceite de oliva es el alimento más representativo de la dieta tradicional mediterránea [7], y son muchas las investigaciones que se han llevado a cabo sobre los beneficios para la salud derivadas de su consumo. Actualmente, queda establecido el efecto preventivo y beneficioso del aceite de oliva y las enfermedades cardiovasculares [8]. La fracción oleosa del aceite de oliva comprende el 98-99% del peso y destaca por su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), principalmente ácido oleico (55-85% del contenido de ácido graso), al que se le atribuyen mayoritariamente los efectos beneficiosos ya que ejercen importantes efectos sobre los perfiles lipídicos. También se atribuyen efectos cardiovasculares beneficiosos a los componentes

minoritarios o micronutrientes de la fracción no oleosa (la cual presenta tan sólo el 1-2% del peso del aceite), habiéndose demostrado que muchos de estos compuestos tienen actividad anti-inflamatoria, propiedades hipolipemiantes y antioxidantes. Entre estos componentes minoritarios del aceite de oliva, cabe destacar los compuestos fenólicos [9].

2.2 Compuestos fenólicos del aceite de oliva y su metabolismo

Los principales compuestos fenólicos del aceite de oliva son los ácidos fenólicos (como hidroxitirosol y tirosol), secoiridoides (como oleuropeína) y lignanos (como pinoresinol). Están presentes básicamente en el aceite de oliva común, cuyo contenido fenólico es medio debido a que se trata de una mezcla de aceite refinado y aceite de oliva, y en el aceite de oliva virgen o virgen extra, cuyo contenido fenólico es alto debido a que se obtiene exclusivamente por procedimientos físicos [10,11].

Para que los compuestos fenólicos o sus metabolitos ejerzan los efectos beneficiosos que se les otorgan, han de ser absorbidos previamente y pasar a la circulación sanguínea. Debido a esto, es fundamental que los compuestos fenólicos sean biodisponibles.

Estudios sobre la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva muestran que existe una buena absorción (mayor del 55-66%), pudiendo ser absorbidos directamente como fenoles simples o en sus formas conjugadas y excretándose al menos un 5% por orina en forma de tirosol e hidroxitirosol [12,13]. Además, el tirosol, hidroxitirosol y sus derivados son absorbidos por los humanos de manera dosis-dependiente según el contenido fenólico del aceite de oliva administrado [14].

Las actividades biológicas de los compuestos fenólicos se atribuyen a sus metabolitos y no a las especies primarias presentes en el aceite de oliva ya que, una vez absorbidos, los fenoles del aceite de oliva se someten a un largo metabolismo intestinal y hepático que conduce a la formación de conjugados tipo sulfato (sulfatación) y glucurónido (glucuronización) por acción de las

enzimas sulfotransferasa y glucotransferasa, respectivamente. Otra etapa metabólica importante es la metilación por la catecol-O-metiltransferasa. De esta forma, las concentraciones de sus formas libres son prácticamente indetectables en los fluidos corporales.

La mayor parte de estudios del metabolismo de los antioxidantes del aceite de oliva se han centrado en el hidroxitirosol, el tirosol y otros derivados de la oleuropeína [13,15,16].

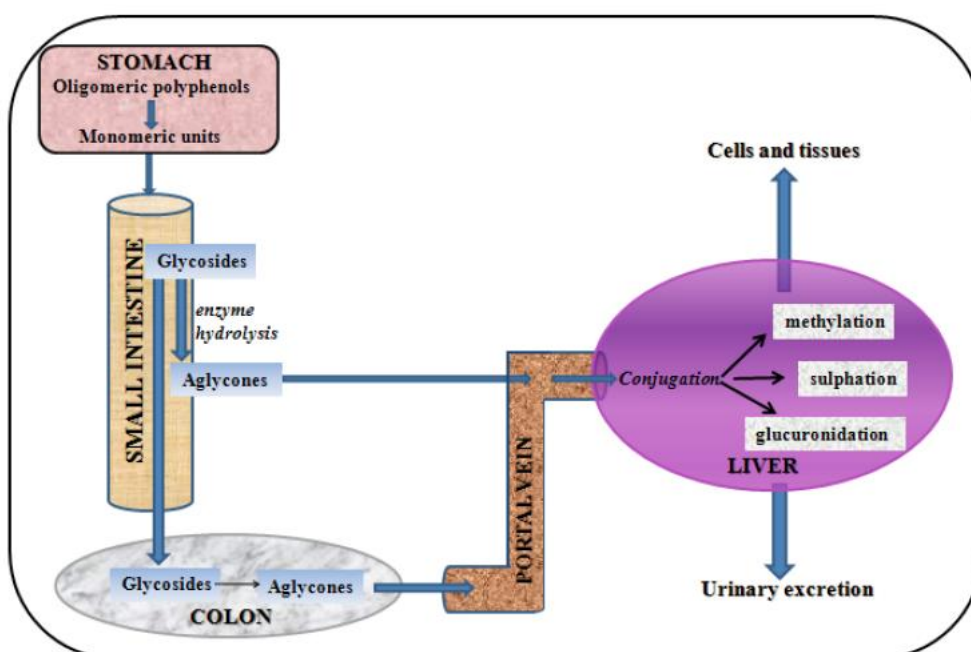


Figura 1. Esquema del proceso de absorción y metabolismo de los compuestos fenólicos [17].

2.3 Importancia de las LDL y HDL en enfermedades cardiovasculares

La aterosclerosis, que comprende la enfermedad coronaria, enfermedad cerebrovascular y enfermedad arterial periférica, es responsable de la mayoría de los casos de enfermedad cardiovascular.

Los niveles séricos elevados de lipoproteínas de baja densidad (LDL) desempeñan un papel importante en la iniciación y progresión de la aterosclerosis [18], siendo especialmente proaterogénicas cuando se presentan en su forma oxidada [19]. En cambio, los niveles séricos de lipoproteínas de

alta densidad (HDL), se correlacionan de forma independiente e inversa con la presencia y riesgo de enfermedad cardiovascular, indicando que las HDL constituyen un factor protector antiaterogénico [20].

Los mecanismos implicados en las propiedades antiaterogénicas de las HDL son varios, jugando el transporte reverso de colesterol un papel importante. El colesterol HDL también ejerce acciones antiaterogénicas a través de sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, debido a que posee enzimas como la paraoxonasa 1 (PON1), que pueden proteger contra la oxidación y la inflamación. Además, actúa como un neutralizador eficaz de aniones superóxido, por lo que puede proteger a las LDL de la modificación oxidativa *in vitro* [21].

La prevención y/o disminución de la susceptibilidad a la oxidación de los lípidos y lipoproteínas presentes en las LDL son los principales mecanismos que se contemplan para explicar los efectos preventivos del aceite de oliva en el desarrollo de la aterosclerosis, ya que la oxidación de las LDL conduce a un cambio en su conformación, aumentando su capacidad de entrar en el sistema monocito/macrófago de la pared arterial y favoreciendo, de esta manera, el proceso aterosclerótico. Esta disminución del daño y de la susceptibilidad de las LDL a la oxidación promovido por el aceite de oliva no depende únicamente de la variación en el contenido de ácidos grasos de las LDL incrementando el contenido de ácido oleico y la relación ácido oleico/linoleico, sino también de las propiedades antioxidantes de algunos componentes como, por ejemplo, la vitamina E y los polifenoles [19,22].

3. Hipótesis

Los aceites de oliva enriquecidos en compuestos fenólicos aparecen como una buena estrategia de alimento funcional tras demostrarse las propiedades antioxidantes y la mejora sobre el perfil lipídico de estos compuestos. Sin embargo se ha visto que un aporte único de una dosis muy alta de un tipo de antioxidante podría tener un efecto indeseado aumentando el estrés oxidativo. Además, los fenoles del aceite de oliva aportan un carácter amargo indeseado para los consumidores. Es por esto que se planteó el diseño de dos aceites funcionales, un aceite de oliva enriquecido con sus propios fenoles y otro con la misma dosis de fenoles pero complementado con otra fuente fenólica, concretamente tomillo.

Uno de los principales factores a tener en cuenta previamente a determinar los posibles efectos sobre la salud de los compuestos fenólicos del aceite de oliva es la determinación de su biodisponibilidad, es decir, ver de qué forma se absorben y se metabolizan para, posteriormente, ejercer su efecto en diferentes tejidos diana.

Una posible diana de los compuestos fenólicos son las lipoproteínas de alta densidad (HDL), cuya principal función es el transporte reverso del colesterol. No obstante, esto significa un intercambio con las otras lipoproteínas (LDL, VLDL) no solo de colesterol sino también ácidos grasos oxidados, haciéndolas susceptibles de ser oxidadas también y, de esta manera, disminuyendo sus funciones beneficiosas. Así pues, resulta necesario saber con qué tipo de defensas antioxidantes cuentan las HDL que las protejan de los ataques de los radicales libres, siendo en este punto donde los compuestos fenólicos pueden actuar.

Hasta donde sabemos, no existen estudios que describan métodos de análisis para la identificación y cuantificación de metabolitos de compuestos fenólicos en HDL. Así, surge la necesidad de desarrollar un método analítico que permita identificar y cuantificar los metabolitos en HDL a la baja concentración en la que se encuentran (ng/mL o nM). La cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a la espectrometría de masas en tándem, UPLC-MSMS,

se vislumbra como una excelente opción para tal propósito, debido a su elevada selectividad y sensibilidad.

La hipótesis que se plantea en este trabajo es que una vez absorbidos los compuestos fenólicos del aceite de oliva y del tomillo, existen metabolitos que podrían incorporarse en las lipoproteínas HDL y contribuir en la mejora de su funcionalidad.

4. Objetivos

El objetivo principal de esta investigación es el de evaluar cómo afecta el consumo de diferentes aceites de oliva enriquecidos con diferentes fuentes fenólicas en la composición de fenoles de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y sus implicaciones en la salud.

Los objetivos secundarios de la investigación son:

- Determinar la composición de fenoles de aceite de oliva y tomillo en plasma y, por tanto, estudiar la biodisponibilidad de estos compuestos.
- Determinar qué metabolitos presentes en plasma podrían ser biomarcadores de consumo de los aceites, estableciendo correlaciones entre grado de cumplimiento de ingesta de aceites y concentración plasmática de metabolitos fenólicos.
- Desarrollar un método analítico para la determinación de compuestos fenólicos y sus metabolitos en las HDL mediante cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas.
- Evaluar cómo afecta el consumo de diferentes aceites de oliva enriquecidos con diferentes fuentes fenólicas en la composición de fenoles de las HDL y sus implicaciones en la salud.
- Contribuir al desarrollo de prototipos de aceites de oliva nutracéuticos que podrían ser recomendados para los individuos con alto riesgo cardiovascular.

5. Material y métodos

5.1 Diseño del estudio

El diseño del estudio es un ensayo clínico aleatorizado y cruzado, en el que 19 individuos (10 hombres y 9 mujeres) recibieron 25 mL/día de aceite crudo durante tres períodos de tres semanas. Los aceites administrados fueron los siguientes:

- VOO (Aceite de Oliva Virgen o Control). Aceite con bajo contenido en compuestos fenólicos (80 ppm), y se utiliza como aceite control.
- FOO1 (Aceite de Oliva Funcional 1). Aceite de oliva virgen (VOO) enriquecido con sus propios compuestos fenólicos, a través de un procedimiento desarrollado en el Departamento de Tecnología de los Alimentos, Universidad de Lleida (UdL). La concentración de compuestos fenólicos es de 500 ppm. De esta manera, se trata de un aceite de oliva funcional enriquecido con sus fenoles naturales.
- FOO2 (Aceite de Oliva Funcional 2). Aceite de oliva virgen (VOO) enriquecido con sus propios compuestos fenólicos (250 ppm) y compuestos fenólicos del tomillo (250 ppm) a través de un procedimiento desarrollado en el Departamento de Tecnología de los Alimentos, Universidad de Lleida (UdL). La concentración final de compuestos fenólicos es de 500 ppm.

Previamente al inicio del ensayo y a la administración de cada aceite se realizó un período de *wash-out* de dos semanas, en el que los participantes tan solo podían consumir aceite de oliva refinado ya que no contiene fenoles. También habían de evitar consumir alimentos ricos en compuestos antioxidantes (verduras, legumbres, fruta, té, café, chocolate, vino y cerveza).

El aceite fue suministrado de forma dosificada en botellas de 25 mL, una para cada día (21 botellas para cada uno de los tres periodos de intervención). Tras cada período de intervención de consumo de aceite de oliva, los individuos

devolvieron las botellas de aceite para así registrar el grado de cumplimiento. El diseño del estudio se muestra a continuación (Figura 2), donde se distribuyen los individuos en tres grupos de intervención de forma aleatorizada.

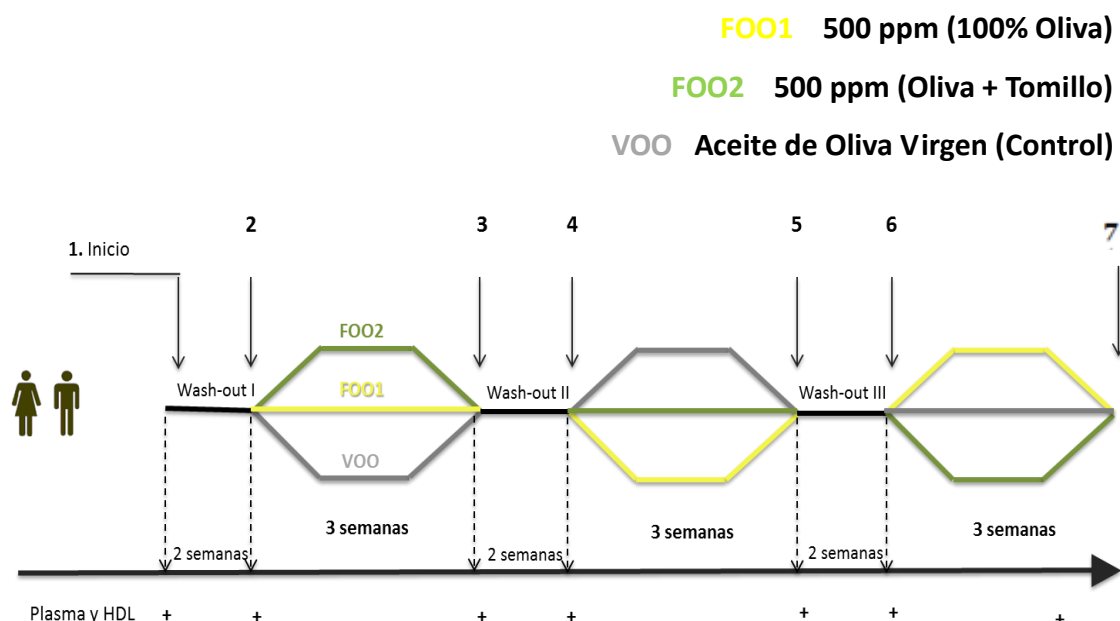


Figura 2. Diseño del estudio. Es un estudio cruzado: los 19 individuos fueron divididos en tres grupos de forma aleatoria y siguieron tres órdenes de ingesta de los tres aceites.

Los 19 participantes del estudio se reclutaron a partir de Centros de Atención Primaria (CAP) e informados sobre los objetivos del estudio, obteniendo su consentimiento firmado. La gestión del estudio se llevó a cabo en el IMIM-Hospital del Mar de Barcelona

El criterio de inclusión principal era que los sujetos debían estar diagnosticados de hipercolesterolemia ($>200\text{mg/dL}$ colesterol total).

Los criterios de exclusión fueron los siguientes: cambio de tratamiento farmacológico en los últimos 3 meses, deportistas con elevada actividad física (>3000 Kcal/semana en actividad física), obesidad ($\text{IMC}>35$), diabetes, ser fumador, vegetarianismo, alergias múltiples y celiaquía u otras enfermedades intestinales.

5.2 Equipos, material y disoluciones

5.2.1 Equipos y material

- Vórtex.
- Centrífuga HETTICH Universal 320-R.
- UPLC AcQuity™ acoplada a un detector de masas en tándem (Waters).
- Bomba de vacío (Manifold) Visiprep NO 5-7030, Supelco (Bellefonte, USA).
- SPE-Manifold.
- μ SPE-Manifold.
- Material de laboratorio de uso habitual (micropipetas, pipeta Pasteur, eppendorf, matraz aforado, tubos de ensayo).
- Cartuchos Oasis HLB μ Elution plate 30 μ m de Waters (Milford, USA).
- Cartuchos Oasis HLB 3cc (60mg) de Waters (Milford, USA).
- Recolector de cartuchos Oasis.

5.2.2 Reactivos y disoluciones

- Metanol HPLC (Scharlau).
- Ácido fosfórico 85% (Panreac).
- Agua Milli-Q.
- Ácido acético (Scharlau).
- Agua ácida. Agua Milli-Q y añadir ácido acético hasta alcanzar un pH 2.

- Disolución de ácido fosfórico 4%. En un matraz aforado de 100 ml añadir 4,7 mL de ácido fosfórico 85% y enrasar hasta 100 ml con agua Milli-Q.
- Disolución Metanol 5%. En un matraz aforado de 100 ml añadir 5 ml de metanol y enrasar a 100 ml con agua Milli-Q.
- Patrón interno: catecol 20 ppm disuelto con ácido fosfórico 4%. En un matraz aforado de 2 ml añadir 26 μ L de catecol 1500 ppm y enrasar a 2 ml con ácido fosfórico 4%.

5.3 Extracción de los compuestos fenólicos

Las muestras de plasma humano y HDL fueron pretratadas con el fin de eliminar interferencias de la matriz de la muestra y preconcentrar los compuestos fenólicos, ya que éstos se encuentran a niveles traza. La técnica utilizada para lograr tal objetivo ha sido la microelution extracción en fase sólida (μ SPE) en muestras de plasma humano, y la extracción en fase sólida (SPE) en las muestras de HDL.

5.3.1 Extracción en plasma

Para el pretratamiento de las muestras de plasma se utilizó el método desarrollado previamente en el mismo laboratorio [23]. El procedimiento seguido fue el siguiente:

- Se mezclan 350 μ L de plasma con 300 μ L de ácido fosfórico al 4% con el objetivo de precipitar las proteínas. Añadir 50 μ L de patrón interno (catecol 20 ppm), agitarlo en vórtex durante 15 segundos y, finalmente centrifugar a 1500 ppm, 4 °C durante 5 min.
- La extracción de los compuestos fenólicos se lleva a cabo mediante microelution en fase sólida (μ SPE) con micro-cartuchos Oasis HLB. Estos micro-cartuchos tienen 2 mg de sorbente:
 - Se coloca la microplaca Oasis, que contiene 96 micro-cartuchos HLB, en el adaptador y se genera el vacío. Para acondicionar el

micro-cartucho se añaden 250 μ L de metanol y 250 μ L de agua ácida.

- A continuación, se introduce la mezcla de plasma y ácido fosfórico 4%. Se deja eluir la mezcla y el micro-cartucho se lava con 100 μ L de agua Milli-Q y con 100 μ L de metanol al 5%.
- Se rompe el vacío, se retira el recipiente con los residuos recogidos y se reemplaza por la placa recolectora.
- Los compuestos fenólicos retenidos en el micro-cartucho se eluyen con 50 μ L metanol dos veces. El factor de preconcentración es de 3.5 (se carga 350 μ L de muestra y se eluye con 100 μ L de metanol).

5.3.2 Extracción de HDL

Para el pretratamiento de las HDL no se pudieron usar los micro-cartuchos de μ SPE debido a que los metabolitos fenólicos se encontraban a concentraciones más bajas que en plasma y era necesaria una preconcentración mayor de los analitos. Es por eso que se optó por extracción de fase sólida con cartuchos Oasis HLB de capacidad de 60 mg. En este caso el procedimiento seguido para la extracción de los compuestos fenólicos de HDL humano fue el siguiente:

- En un tubo de ensayo se mezclan 500 μ L de la muestra de HDL, 500 μ L de agua Milli-Q, 60 μ L de ácido fosfórico al 85% y 100 μ L de patrón interno (catecol 20 ppm). La solución resultante se agita en vórtex durante 10 segundos.
- La extracción de los compuestos fenólicos se llevó a cabo mediante la extracción en fase sólida (SPE):
 - Se colocan los cartuchos Oasis HLB 3cc (60 mg) de Waters en el adaptador y se genera el vacío. Para acondicionar (activar) los cartuchos se añaden 2 mL de metanol y 2 mL de agua ácida.

- A continuación se introduce la mezcla de HDL, se deja eluir y los cartuchos se lavan con 2 mL de agua ácida y con 2 mL de metanol al 5%.
 - Se rompe el vacío y se substituyen los tubos de residuos por tubos de ensayo.
 - La elución de los compuestos fenólicos retenidos en el cartucho se lleva a cabo con 3 mL de metanol.
- Para preconcentrar la muestra se evapora la solución eluida con corriente de N₂ hasta la sequedad total. Posteriormente se reconstituye con 50 µL de metanol y con la ayuda del vórtex durante 1 minuto. El factor de preconcentración es de 10 (se carga 500 µL de muestra y se eluye con 50 µL de metanol).
 - Se cambian los tubos de ensayo a eppendorf y se centrifuga la muestra durante 5 minutos a 9000 rpm y 5 °C.
 - Se analiza el sobrenadante por UPLC-MS/MS.

5.4 Análisis cromatográfico mediante UPLC-MS/MS

UPLC (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*) acoplado a un detector de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) fue la técnica de análisis escogida debido a su sensibilidad y selectividad. UPLC-MS/MS permite la detección e identificación de los compuestos y sus metabolitos a concentraciones muy bajas, en el rango de nmolar (nM).

Para la determinación de los compuestos fenolicos y sus metabolitos en las muestras de plasma y HDL, se utilizaron las condiciones cromatográficas descritas por Suárez *et al.* [23].

5.5 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos, se realizó un análisis de varianza de tipo ANOVA para comparar los valores de concentración de los compuestos fenólicos antes y después del tratamiento con los aceites.

El programa estadístico utilizado para llevar a cabo este análisis fue Statgraphics Plus 5.0.

6. Resultados

6.1 Grado de cumplimiento

Para determinar el grado de adherencia al estudio por parte de los voluntarios referente a la ingesta de los diferentes aceites a lo largo del estudio, se les administró el aceite de forma dosificada en botellas de 25 mL (una para cada día) y se les pidió que devolvieran todas las botellas al final de cada intervención de cada aceite.

De esta manera se registró cuántas botellas habían dejado llenas, con un tercio de aceite o con el fondo de la botella de aceite y se establecieron unos grados de cumplimiento del 1 al 4 según los criterios establecidos que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Criterios establecidos para determinar el grado de cumplimiento.

Grado	Volumen remanente en la botella	Número de botellas
4: Muy alto	Llena	0
	Un tercio lleno	5 o <
	Fondo	15 o <
3: Alto	Llena	0
	Un tercio lleno	5 o <
	Fondo	> 15
2: Medio	Llena	1 – 5
1: Bajo	Llena	> 5

Tabla 2. Grado de cumplimiento de ingesta de cada aceite de cada individuo.

Individuo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	Promedio
VOO1	4	4	4	2	2	4	4	2	3	2	2	4	3	4	3	2	2	2	3	2,95
FOO1	3	4	2	1	2	3	2	2	3	2	2	2	3	2	3	3	4	2	3	2,52
FOO2	2	2	2	2	3	3	2	2	3	2	2	2	2	4	2	2	2	2	3	2,32

El mayor grado de cumplimiento fue del aceite VOO (control), con un promedio de 3 mientras el menor con un promedio de 2,35 fue del aceite funcional 2 (FOO2). Podemos decir que los individuos tuvieron un cumplimiento alto en la ingesta del aceite control, mientras el de los aceites funcionales (FOO1, FOO2) fue entre medio y alto lo que se consideró también aceptable. Estas diferencias se podrían atribuir a las características organolépticas más suaves del aceite control y por tanto de mayor preferencia y adherencia, en cambio los aceites funcionales al contener un nivel más alto de compuestos fenólicos, los cuales proporcionan al aceite un sabor más intenso y amargo, posiblemente causaron un menor grado de cumplimiento de ingesta. El menor cumplimiento del aceite enriquecido con fenoles de tomillo, también se podría atribuir al sabor aromatizado y poco corriente en aceites de consumo habitual.

6.2 Marcadores de consumo de fenoles en plasma

Después del análisis cromatográfico de las muestras de plasma se definieron los metabolitos biomarcadores de consumo del aceite FOO1 (enriquecido solo con fenoles de oliva) y los biomarcadores de consumo del aceite FOO2 (enriquecido con fenoles de oliva y tomillo). Estos metabolitos fueron los que se encontraron en concentraciones más elevadas en los plasmas y en un mayor número de individuos, y por tanto serían buenos indicadores de cumplimiento de la ingesta de los aceites. De esta manera se espera que las concentraciones de los diferentes metabolitos en plasma se correlacionen positivamente con el grado de cumplimiento de cada individuo establecido

según los criterios anteriormente mencionados. Esta correlación se evalúa más adelante.

Los metabolitos derivados de la oliva procedentes tanto del aceite FOO1 como del aceite FOO2 elegidos como marcadores de consumo son los siguientes (Figura 3):

- Hidroxitirosol sulfato
- Alcohol homovanílico sulfato
- Hidroxitirosol acetato sulfato

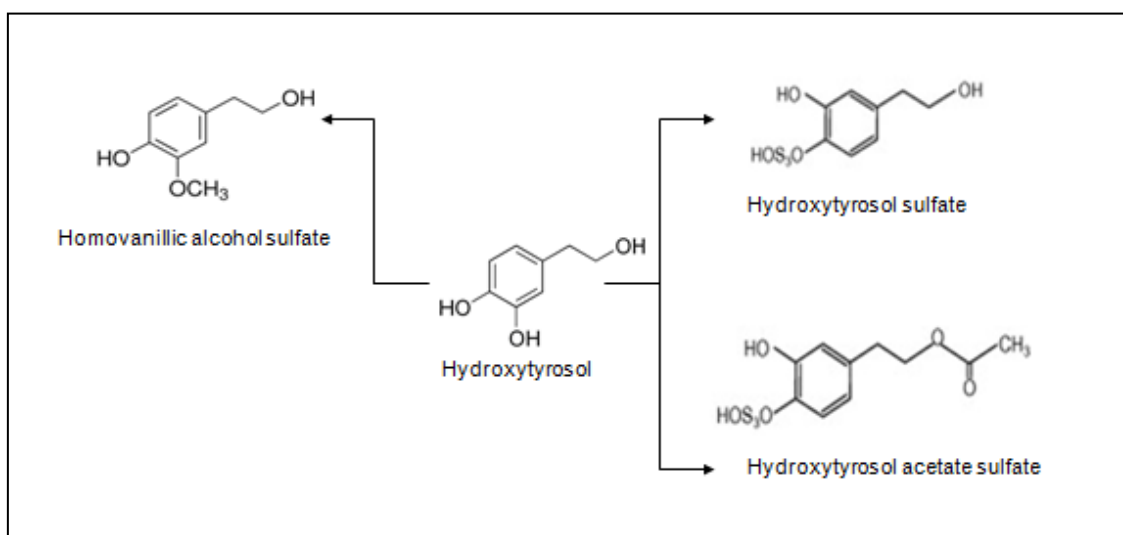


Figura 3. Estructura química del hidroxitirosol y sus formas conjugadas.

Los resultados muestran que los metabolitos derivados de la oliva también se encuentran a nivel basal, ya que incluso después de cada periodo de lavado o *wash-out* estos se detectan en el plasma, aunque a niveles menores en comparación con los observados después de la ingesta de los aceites enriquecidos (Figura 4).

Después de la ingesta de los aceites enriquecidos hay un aumento significativo de estos marcadores respecto al *wash-out* y respecto al aceite de oliva control bajo en fenoles, por tanto serían buenos marcadores de consumo. Las concentraciones son más altas en el aceite FOO1 que en el aceite FOO2

(aproximadamente el doble) ya que el aceite FOO1 contiene solamente fenoles propios de la oliva, mientras el aceite FOO2 aunque dispone de una concentración final de fenoles totales igual que FOO1, un 50% de los fenoles corresponde a los fenoles de oliva y el otro 50% a fenoles de tomillo.

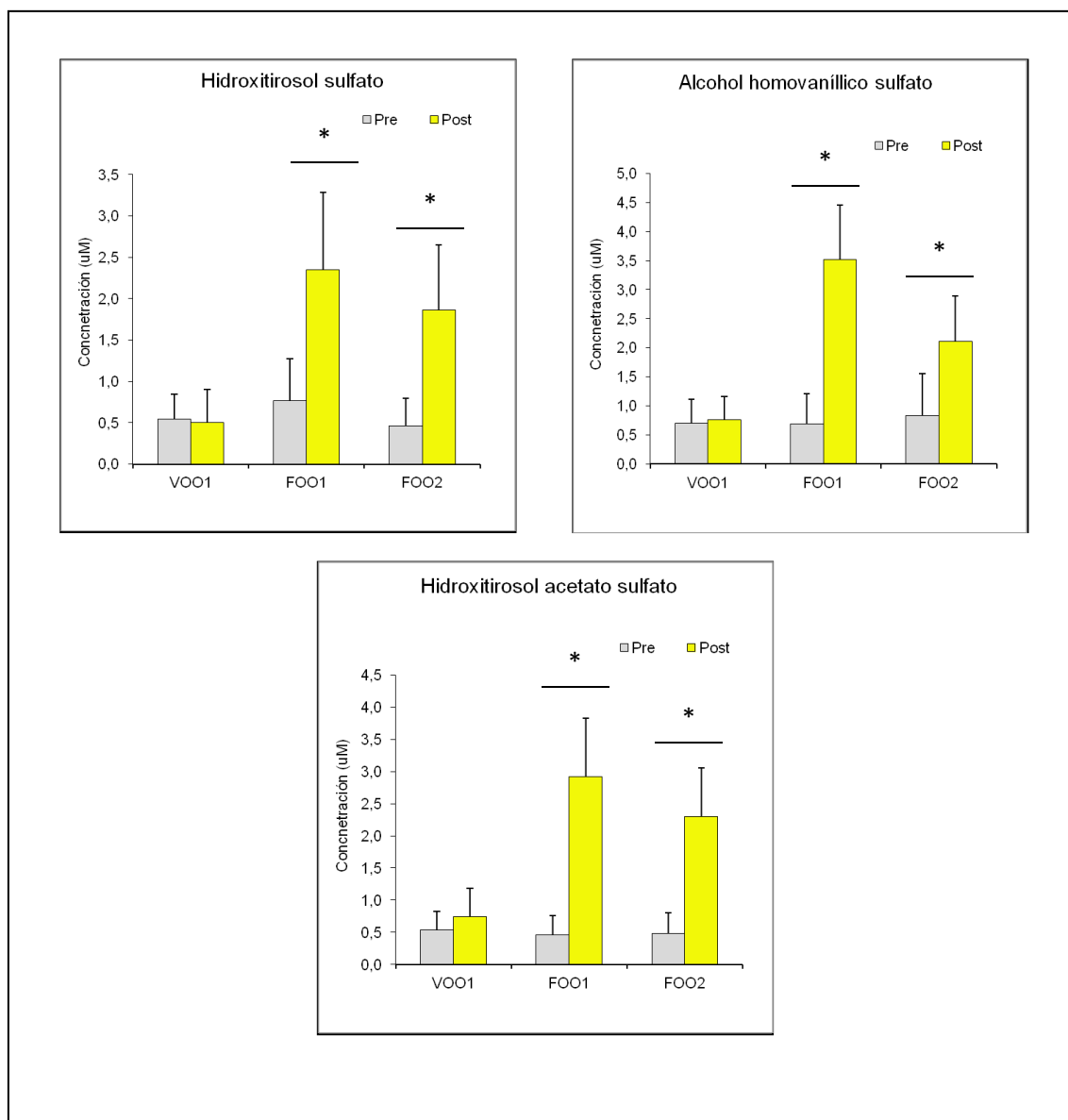


Figura 4. Concentraciones pre y post ingesta de cada aceite de los metabolitos biomarcadores derivados de la oliva presentes en plasma. [*] Diferencias estadísticamente significativas entre pre y post tratamiento por $P < 0.05$

En el caso de los metabolitos derivados del tomillo procedentes del aceite FOO2, los elegidos como marcadores de consumo son los siguientes (Figura 5):

- Timol sulfato
- Ácido cafeico sulfato
- Ácido hidroxifenilpropionico sulfato

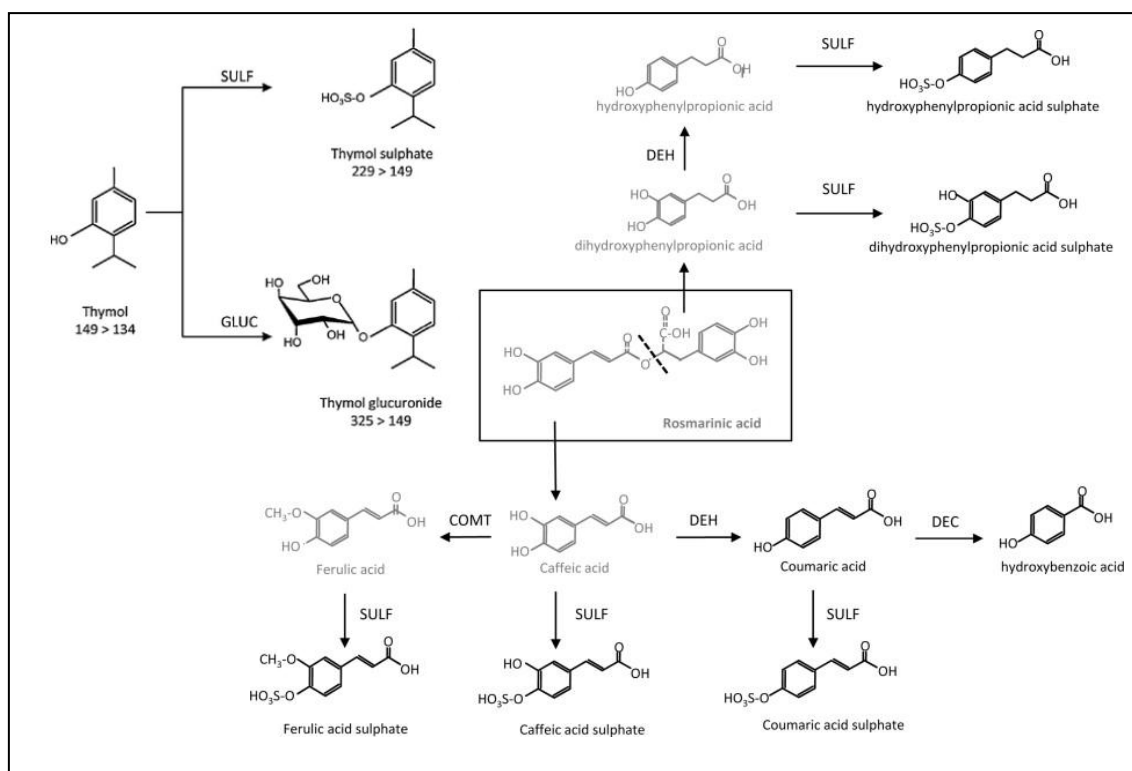


Figura 5. Estructura química y vías metabólicas del timol y ácido rosmarínico [24].

Estos aparecen como claros marcadores de ingesta del aceite FOO2 ya que prácticamente solo aparecen después de la ingesta del aceite FOO2 (Figura 6) y en concentraciones más altas comparado con los metabolitos de la oliva (excepto el ácido cafeico sulfato que se encuentra en concentraciones similares).

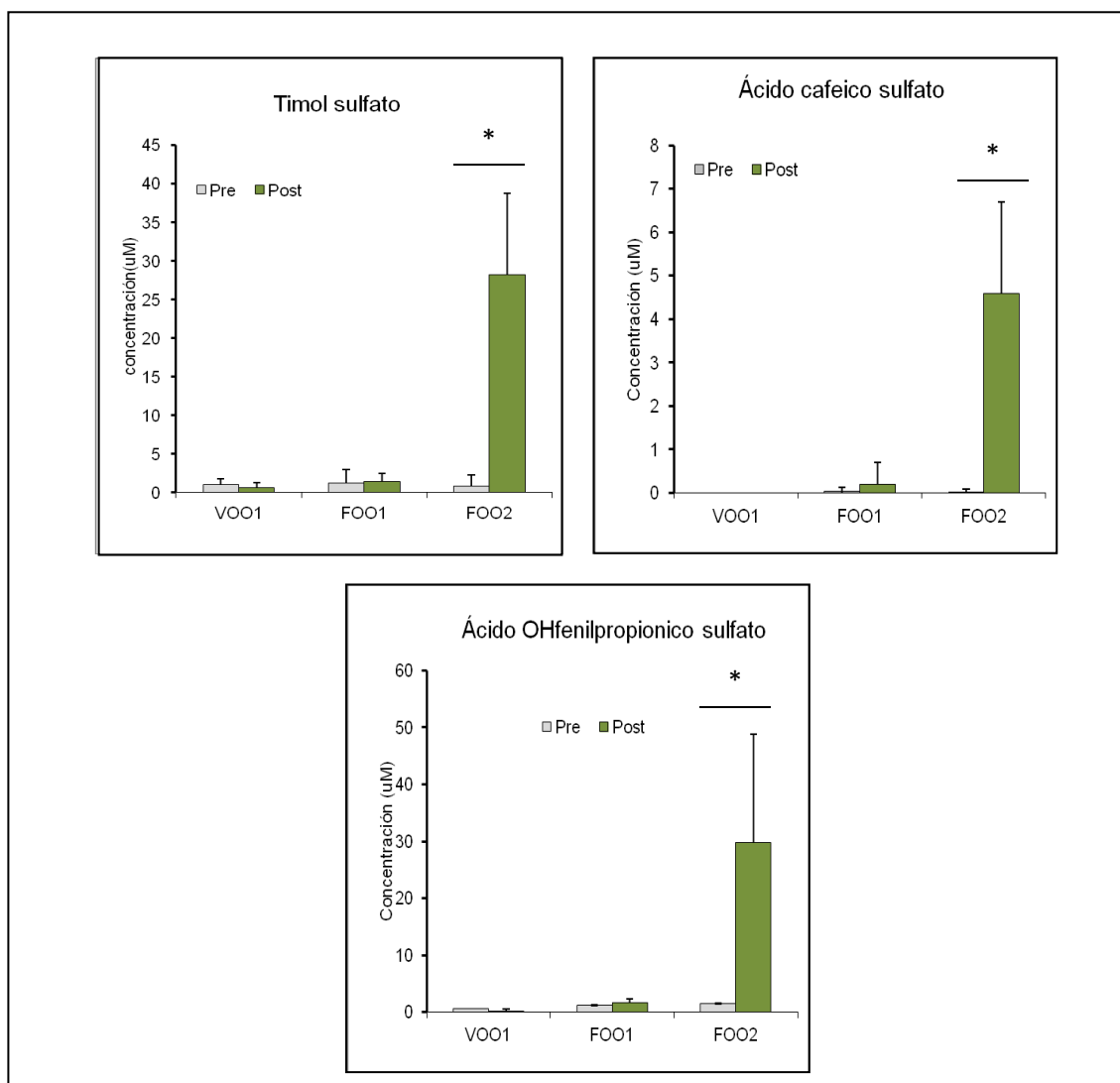


Figura 6. Concentraciones pre y post ingesta de cada aceite de los metabolitos biomarcadores derivados del tomillo presentes en plasma. [*] diferencias estadísticamente significativas entre pre y post tratamiento por $P < 0.05$

6.3 Relación del grado de cumplimiento y la concentración fenólica en plasma.

Una vez identificados los metabolitos marcadores de consumo de los aceites enriquecidos se estudió la posible relación entre el grado de cumplimiento de ingesta de los diferentes aceites por parte de los individuos con las concentraciones de los principales marcadores presentes en plasma. Para esto, se elaboraron gráficos de correlación y se calcularon los coeficientes de

correlación de Pearson. Los valores de “r cuadrado” y los coeficientes se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Resumen de las correlaciones entre las concentraciones de los metabolitos de la oliva y del tomillo y el grado de cumplimiento de ingesta de los aceites FOO1 y FOO2.

Metabolitos	FOO1		FOO2	
	R ²	Coef. Correlación	R ²	Coef. Correlación
Hidroxitirosol sulfato	0.377	0.614	0.070	-0.265
Alcohol homovanílico sulfato	0.596	0.772	0.001	0.028
Hidroxitirosol acetato sulfato	0.370	0.608	0.005	0.071
Timol sulfato	-	-	0.081	0.284
Ácido cafeico sulfato	-	-	0.129	0.359
Ácido Hidroxifenilpropionico sulfato	-	-	0.074	0.271

En los resultados se observa que a excepción del hidroxitirosol sulfato, hay una correlación bastante clara entre la concentración de metabolitos derivados de la oliva y el grado de cumplimiento de la ingesta del aceite FOO1 (Figura 7). Aun así se aprecia una gran variabilidad de valores entre los individuos. En cambio, esta correlación no puede verse en el caso del aceite de oliva FOO2, donde en ninguno de los marcadores se asocia una correlación positiva entre el cumplimiento y la concentración de metabolitos en plasma (no se muestran los gráficos de correlación).

En cuanto a los metabolitos derivados del tomillo, se ha observado cierta correlación entre la concentración de metabolitos derivados del tomillo y el grado de cumplimiento de la ingesta del aceite FOO2 (Figura 8).

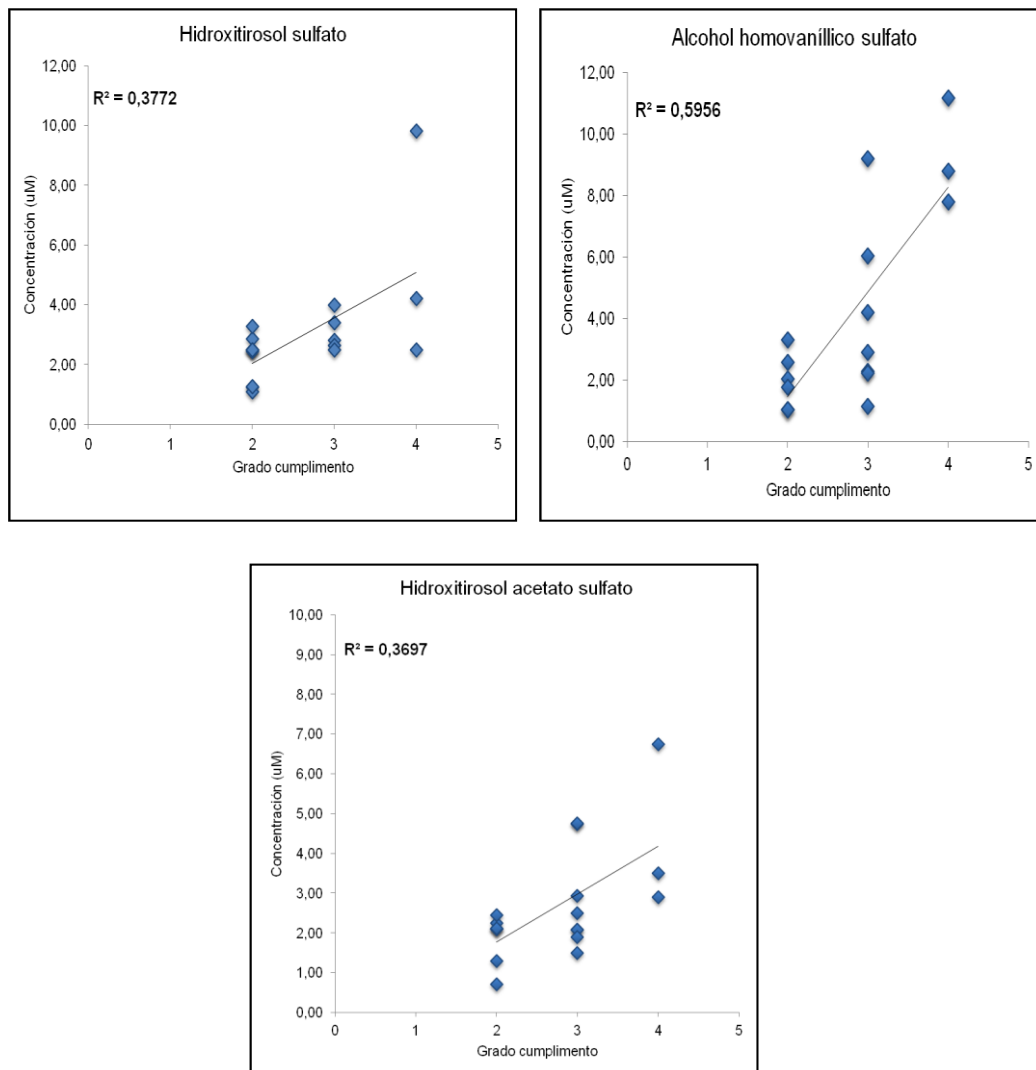


Figura 7. Correlación entre el grado de cumplimiento de ingesta del aceite F001 y la concentración de metabolitos derivados de la oliva.

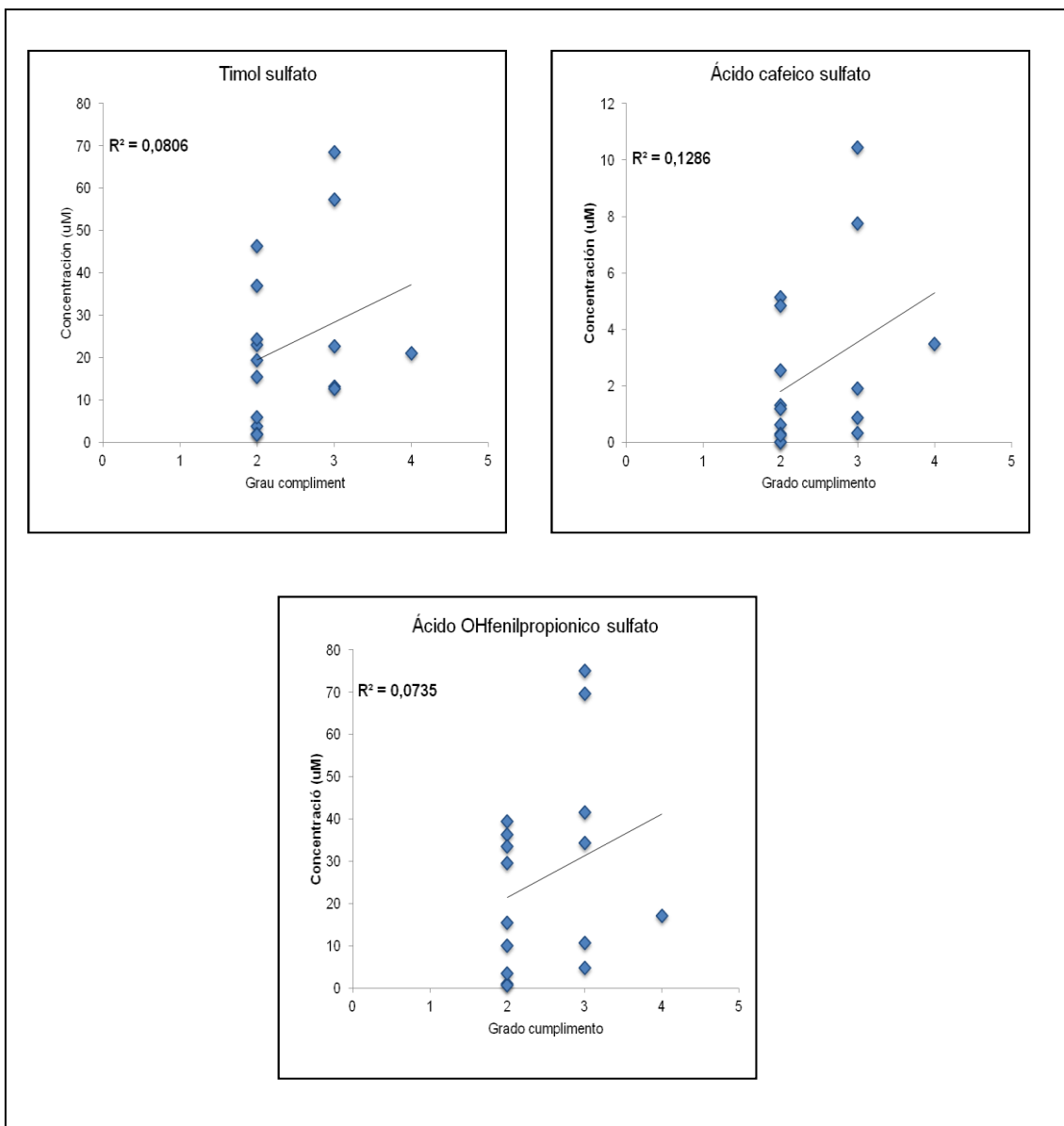


Figura 8. Correlación entre el grado de cumplimiento de ingesta del aceite F002 y la concentración metabolitos derivados del tomillo.

6.4 Metabolitos fenólicos en HDL

Una vez comprobada la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos de los aceites enriquecidos confirmando la presencia de los metabolitos en plasma, se procedió al análisis de las HDL aisladas del plasma para ver si estos metabolitos son capaces de adherirse a las lipoproteínas.

El único metabolito procedente de los fenoles del aceite de oliva detectado en las HDL fue el alcohol homovanílico sulfato (Figura 9) y solo se encontró en cuatro de los diecinueve individuos (21.05%).

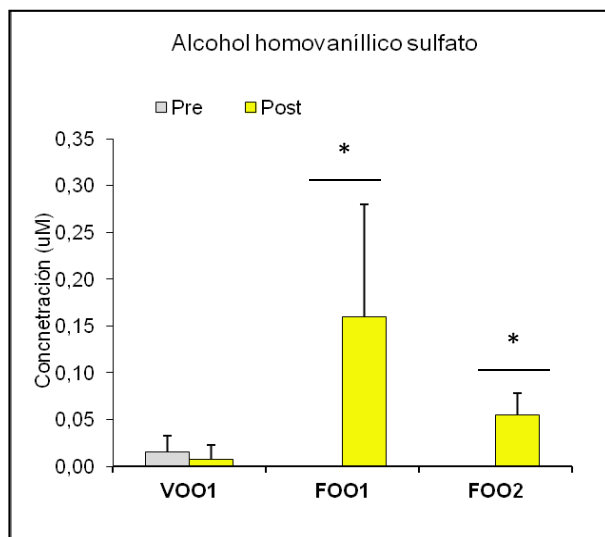


Figura 9. Concentración de alcohol homovanílico sulfato en HDL antes (pre) y después (post) de la ingesta de los diferentes aceites. [*] diferencias estadísticamente significativas entre pre y post tratamiento ($p < 0.05$)

En cuanto a los metabolitos procedentes de los fenoles del tomillo, se detectaron los mismos que aparecieron en plasma como biomarcadores de consumo, destacando el timol sulfato que se encontró en concentraciones bastante elevadas. Los gráficos de concentraciones se muestran en la Figura 10.

Se observa que tanto el alcohol homovanílico sulfato como los metabolitos derivados del tomillo detectados en las HDL presentaron diferencias estadísticas entre el pre- y el post-tratamiento.

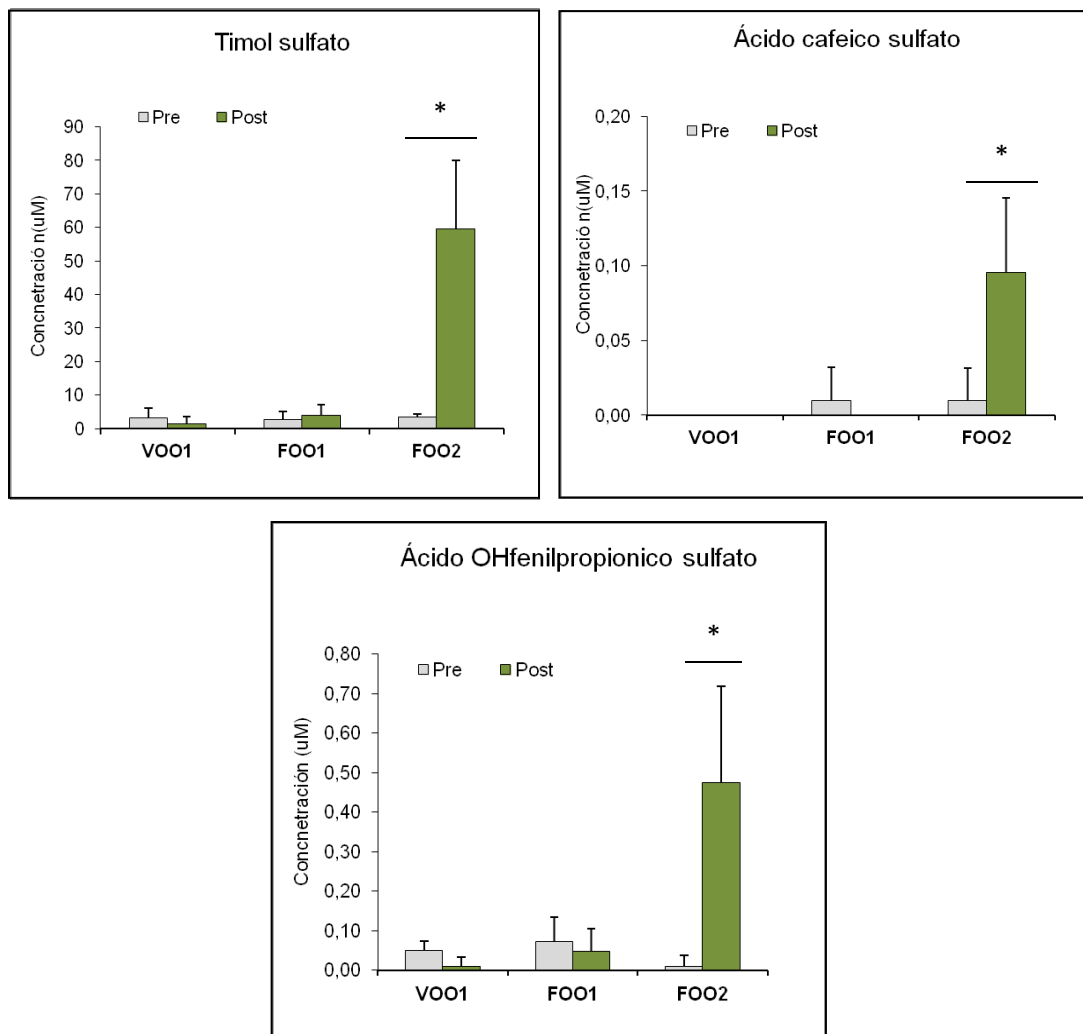


Figura 10. Concentración metabolitos derivados del tomillo en HDL pre- y post-ingesta de los diferentes aceites. [*] Diferencias estadísticamente significativas entre pre- y post-tratamiento por $P < 0.05$

7. Discusión

El presente trabajo se enmarca en un proyecto coordinado cuyo objetivo es el de desarrollar aceites de oliva funcionales enriquecidos con polifenoles y evaluar su bioactividad en relación a la funcionalidad de las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Entendiendo como mejora de la funcionalidad, una mejora en el intercambio a través de membrana del colesterol, lo que facilitaría su transporte mediante las HDL y posterior eliminación a través del hígado.

Para determinar los posibles efectos sobre la salud de los compuestos fenólicos, es fundamental contar con información cuantitativa de la ingesta de estos componentes y sobre todo saber de qué forma se absorben y se metabolizan para posteriormente ejercer su efecto en los diferentes tejidos diana.

Los métodos que se utilizan principalmente en la evaluación de la ingesta en los estudios de nutrición suelen ser poco precisos (cuestionario de frecuencia de consumo, recordatorio 24h, etc). Generalmente, el consumo registrado de los alimentos percibidos como no saludables (alimentos con alto contenido de grasa y de azúcar o procesados) es inferior al real, en cambio la ingesta de frutas y hortalizas, que representan las principales fuentes dietéticas de polifenoles, a menudo es superior al consumo real. Otro problema es que actualmente la información sobre la diversidad y la cantidad de polifenoles presentes en los alimentos es limitada. Por ello cabe destacar la importancia de los biomarcadores de ingesta o exposición alimentaria, ya que son capaces de evaluar objetivamente y con precisión la ingesta dietética. Pueden clasificarse en marcadores a corto plazo (refleja la ingesta pasadas 2 horas), a medio plazo (refleja la ingesta de semanas o meses) y a largo plazo (refleja la ingesta de varios meses o incluso años), siendo un factor determinante el tipo de muestra que se analiza (plasma, orina, etc.) [25,26].

Los metabolitos identificados y cuantificados en el presente estudio en plasma podrían ser por tanto buenos biomarcadores de consumo de los aceites enriquecidos, por una parte debido a que los metabolitos derivados del aceite de oliva FOO1 y del aceite de oliva FOO2 se han encontrado en

concentraciones elevadas en el plasma y observándose además correlación entre el grado de cumplimiento de ingesta de aceites y las concentración plasmática de metabolitos fenólicos. Aun así, se aprecia una gran variabilidad de valores entre los individuos, que puede ser atribuida en parte a la variabilidad en la expresión de enzimas que metabolizan y transportan debido a la variabilidad genética entre los individuos [26].

A través de los resultados obtenidos después del análisis cromatográfico de las muestras de plasma, los biomarcadores elegidos del aceite de oliva enriquecido con sus propios fenoles fueron el hydroxytyrosol sulfato, alcohol homovanílico sulfato y hidroxitirosol acetato sulfato, y los biomarcadores del aceite de oliva enriquecido con tomillo fueron timol sulfato, ácido hidroxifenilpropiónico sulfato y ácido cafeico sulfato que, a su vez, pueden ser indicadores de consumo.

Así pues, la cuantificación de biomarcadores en los fluidos biológicos proporciona información valiosa respecto a la ingesta pero también permite evaluar la biodisponibilidad de los fenoles de aceite de oliva y tomillo y pueden ayudar a entender que moléculas son las responsables de los efectos biológicos [25,26].

Respeto a la biodisponibilidad de los fenoles de oliva, estudios previos han permitido describir cuál es el proceso de metabolismo que sufren estos compuestos y que nos permiten explicar el origen de los metabolitos detectados en este estudio. Los fenoles de la oliva pueden ser absorbidos directamente como fenoles simples o como sus formas conjugadas, tales como la oleuropeína y ligustrósido, que se someten a hidrólisis rápida dando lugar a concentraciones altas de hidroxitirosol, metabolito al cual se le han atribuido propiedades beneficiosas antioxidantes más potentes [13]. Los lugares de absorción descritos para el hidroxitirosol son el intestino delgado y el colon, y se ha sugerido que el transporte a través del epitelio intestinal puede tener lugar por difusión pasiva y de forma bidireccional [27]. Una vez absorbidos, los fenoles del aceite de oliva se someten a un largo metabolismo intestinal (en los enterocitos) y hepático (hepatocitos) que conduce a formas conjugadas de hidroxitirosol tipo sulfato (sulfatación) y glucurónido (glucuronización) por

acción de las enzimas sulfotransferasa y glucotransferasa, respectivamente [28]. La sulfatación del hidroxitirosol por las enzimas sulfotransferasa (SULT) da lugar a la producción de hidroxitirosol sulfato, mientras la O-acetilación del grupo hidroxilo del hidroxitirosol da lugar al hidroxitirosol acetato sulfato [29]. Otra etapa metabólica importante es la metilación por la catecol-O-metiltransferasa, de esta manera el hidroxitirosol es convertido en alcohol homovanílico [28] y posteriormente puede sufrir una sulfatación, tal y como se observa en el presente estudio.

A partir de este trabajo se ha demostrado que prácticamente la totalidad de los metabolitos son de tipo sulfato, siendo por tanto la sulfatación el proceso de conjugación más factible para el hidroxitirosol.

Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) de las concentraciones de metabolitos derivados de los fenoles entre pre y post tratamiento han permitido constatar la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos de oliva y tomillo. Tras la ingesta de los aceites hay un aumento significativo de los marcadores respecto al *wash-out* y respecto al aceite de oliva control bajo en fenoles. Las concentraciones en plasma de los metabolitos derivados del aceite de oliva son levemente más altas en el aceite FOO1 que en el aceite FOO2 debido a su mayor contenido en fenoles propios de la oliva. Con esto se puede afirmar que los metabolitos derivados del aceite de oliva se absorben de una manera dosis-dependiente del contenido fenólico del aceite de oliva administrado [14]. En cuanto a los metabolitos derivados del tomillo, las concentraciones en plasma fueron más altas en comparación con las concentraciones de los metabolitos derivados de la oliva, excepto el ácido cafeico sulfato que se encuentra en concentraciones similares. Esto podría ser debido a una mayor absorción de estos compuestos debido a que el timol es una molécula más liposoluble y por tanto sería más fácilmente absorbida por los enterocitos.

Analizada la absorción y biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva y del tomillo, se evaluó cómo afecta su consumo a la composición de las HDL y sus implicaciones en la salud. Los resultados muestran que el único metabolito procedente de los fenoles del aceite de oliva

detectado en las HDL fue el alcohol homovanílico. La adherencia de este compuesto a las lipoproteínas de alta densidad es buena ya que se encontraron diferencias significativas entre la concentración pre- y post-tratamiento. En cuanto a los metabolitos procedentes de los fenoles del tomillo se detectaron los mismos que aparecieron en plasma como biomarcadores de consumo, destacando el timol sulfato que se encontró en concentraciones bastante elevadas. También en estos se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el pre- y el post-tratamiento, aunque solamente tras la ingesta del aceite funcional enriquecido con fenoles del tomillo (FOO2), ya que es el que contiene los compuestos fenólicos del tomillo.

La buena adherencia de estos compuestos podría explicarse por su estructura química. Al tratarse de moléculas pequeñas y lipofílicas pueden penetrar fácilmente en la bicapa lipídica de la biomembrana interactuando con la cadena lateral lipofílica de los fosfolípidos y el colesterol. Debido a su lipofilia se podrían acumular dentro de la bicapa y aumentar la fluidez y la permeabilidad de la biomembrana de las células [30].

8. Conclusiones

El objetivo principal del estudio de intervención es evaluar la bioactividad en relación a la funcionalidad de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) de dos aceites funcionales enriquecidos en compuestos fenólicos, y en un estudio nutricional de estas características es muy importante definir la biodisponibilidad y el metabolismo de los compuestos de interés, con tal de conocer cómo se comportan una vez entran en el organismo y pasan la barrera del metabolismo. De esta forma este trabajo nos aporta información de cuáles podrían ser los potenciales metabolitos que podrían ejercer un efecto beneficioso.

Por primera vez se ha realizado un estudio prolongado en humanos con una ingesta de aceites enriquecidos con fenoles y se ha podido observar que, aunque los compuestos fenólicos sufren un intenso proceso de metabolismo, los metabolitos formados son capaces de permanecer en plasma. Por tanto podemos concluir que los metabolitos descritos en el trabajo podrían ser los responsables de los efectos beneficiosos.

La detección y cuantificación de los metabolitos de compuestos fenólicos en las HDL nos permite confirmar que los metabolitos fenólicos del aceite de oliva y sobre todo los del tomillo son capaces de adherirse e incorporarse a las HDL, pudiendo contribuir en su defensa antioxidante.

Los resultados obtenidos tendrán que ser observados en el conjunto de los otros parámetros relacionados con la funcionalidad de las HDL para poder confirmar que los aceites funcionales mejoran la funcionalidad de las HDL.

9. Referencias bibliográficas

- [1] Fundación Dieta Mediterránea. Dieta Mediterránea. [Consultado 25 de marzo de 2013]. Disponible en internet: <http://dietamediterranea.com>.
- [2] Tyrovolas S, Panagiotakos DB. The role of Mediterranean type of diet on the development of cancer and cardiovascular disease, in the elderly: A systematic review. *Maturitas* 2010;65(2):122-130.
- [3] Karampola M, Papandreou D, Makedou K. The role of Mediterranean diet in health and disease: an updated mini review. *Nutrition & Food Science*. 2011;41(1):63-72.
- [4] Trichopoulou A, Lagiou P. Healthy traditional Mediterranean diet: an expression of culture, history, and lifestyle. *Nutr Rev* 1997;55:383-89.
- [5] Renaud S, de Lorgeril M, Delaye J, Guidollet J, Jacquard F, Mamelle N et al. Cretan Mediterranean diet for prevention of coronary heart disease. *Am J clin Nutr* 1995;61:1360S-7S.
- [6] Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992;339:1523-26.
- [7] Pérez-Jiménez F, Ruano J, Perez-Martinez P, Lopez-Segura F, Lopez-Miranda J. The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. *Molecular Nutrition & Food Research*.
- [8] Serra-Majem LI, ngo de la Cruz J, Ribas L, Tur JA. Olive oil and the Mediterranean diet: beyond the rhetoric. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2003;57(1):S2-S7.
- [9] Frankel EN. Nutritional and biological properties of extra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(3):785-792.
- [10] Gimeno E, de la Torre-Carbot K, Lamuela-Raventós RM, Castellote AI, Fitó M, de la Torre R, et al. Changes in the phenolic content of low density lipoprotein after olive oil consumption in men. A randomized crossover controlled trial. *British Journal of Nutrition*. 2007;98(6):1243-1250.

- [11] EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) EFSA Journal 2011;9(4):2033.
- [12] Vissers MN, Zock PL, Katan MB. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. European Journal of Clinical Nutrition. 2004;58(6):955-965.
- [13] De la Torre-Carbot K, Chávez-Servín JL, Jaúregui O, Castellote AI, Lamuela-Raventós RM, Nurmi T, et al. Elevated Circulating LDL Phenol Levels in Men Who Consumed Virgin Rather Than Refined Olive Oil Are Associated with Less Oxidation of Plasma LDL. Journal of Nutrition. 2010;140(3):501-508.
- [14] Fitó M, De La Torre R, Farré-Albaladejo M, Khymenetz O, Marrugat J, Covas M. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: A review. Annali dell'Istituto Superiore di Sanita. 2007;43(4):374-381.
- [15] Cantero SA. Estudio de la capacidad antioxidante y la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva. Primeras etapas en el desarrollo de un aceite de oliva funcional [tesis doctoral]. Universitat de Lleida. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària; 2009.
- [16] Ávila FC. Efecto del consumo del aceite de oliva en los compuestos fenólicos de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) [tesis]. Universidad de Barcelona. Facultad de Farmacia; 2012.
- [17] D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B, Masella R. "Bioavailability of the polyphenols: status and controversies". International Journal of Molecular Sciences. 2010; 11:1321-1342.
- [18] Badimon L, Vilahur G. LDL-cholesterol versus HDL-cholesterol in the atherosclerotic plaque: inflammatory resolution versus thrombotic chaos. Annals of the New York Academy of Sciences. 2012;1254(1):18-32.
- [19] Covas MI, Nyyssönen K, Poulsen HE, Kaikkonen J, Zunft H-JF, Kiesewetter H, et al. The Effect of Polyphenols in Olive Oil on Heart Disease Risk Factors: A Randomized Trial. Annals of Internal Medicine. 2006;145(5):333-341.

- [20] María del Rosario Laris E, Antonio Arteaga L, Ada cuevas M, Attilio Rigotti R. El colesterol HDL: ¿un nuevo objetivo terapéutico en el manejo de las dislipemias y la aterosclerosis?. *Revista Médica Chile*. 2005;133:823-832.
- [21] Shuhei N, Söderlund S, Jauhiainen M, Taskinen MR. Effect of HDL composition and particle size on the resistance of HDL to the oxidation. *Lipids in Health and Disease*. 2010;9:104.
- [22] Cicero AFG, Nascetti S, López-Sabater MC, Elosua R, Salonen JT, Nyyssönen K, et al. Changes in LDL fatty acid composition as a response to olive oil treatment are inversely related to lipid oxidative damage: The EUROLIVE study. *Journal of the American College of Nutrition*. 2008;27(2):314-320.
- [23] Suarez M., Romero M.P., Macia A., Valls R.M., Fernandez S., Sola R., Motilva M.J. Improved method for identifying and quantifying olive oil phenolic compounds and their metabolites in human plasma by microelution solid-phase extraction plate and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2009;877(32):4097-4106.
- [24] Rubió L., Serra A., Macia A., Borrás X., Romero M.P., Motilva M.J. Validation of determination of plasma metabolites derived from thyme bioactive compounds by improved liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2012;905:75-84.
- [25] Hedrick VE, Dietrich AM, Estabrooks PA, Savla J, Serrano E, Davy BM. Dietary biomarkers: advances, limitations and future directions. *Nutritional Journal*. 2012;11:109.
- [26] Spencer JP, Abd El Mohsen MM, Miniñane AM, Mathers JC. *British Journal of Nutrition*. 2008;99(1):12-22.
- [27] González SMP, Estudio de los efectos cardiovasculares y la absorción oral del hidroxitirosol en modelos de animales y humanos. [tesis]. Universidad de Granada. Departamento de Farmacología; 2005.
- [28] Covas M, Fitó M, Khymenets O, De la Torre R. The bioavailability of olive oil phenolic compounds. *Cardiovascular Risk and Nutrition and Human*

Pharmacology and Clinical Neurosciences Research Groups, Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM-Hospital del Mar), Barcelona, Spain. CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN). Olives and olive oil in health and disease prevention 2010;699-703.

[29] Rubió L, Macià A, Valls RM, Pedret A, Romero M, Solà R, et al. A new hydroxytyrosol metabolite identified in human plasma: Hydroxytyrosol acetate sulphate. Food Chem 2012;134(2):1132-1136.

[30] Herrmann F, Wink M. Synergistic interactions of saponins and monoterpenes in HeLa cells, Cos7 cells and in erythrocytes. Phytomedicine. 2011;18(1):1191-1196.